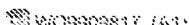


USE OF MARINER TRANSPOSON IN THE PRODUCTION OF TRANSGENIC ANIMALS

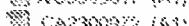
Publication number: JP2001513336 (T)

Also published as:

Publication date: 2001-09-04



Inventor(s):



Applicant(s):



Classification:



- International: A01K67/027; C12N15/09; C12N15/87; C12N15/90; A61K48/00;
A01K67/027; C12N15/09; C12N15/87; A61K48/00; (IPC1-
7); A01K67/027; C12N15/09

- European: A01K67/027M; C12N15/87C; C12N15/90

Application number: JP20000507225T 19980621

Priority number(s): GB19970017913 19970822; GB19980012822 19980612;
WO1998GB02517 19980821

Abstract not available for JP 2001513336 (T)

Abstract of corresponding document: WO 9909817 (A1)

A method for the preparation of a transgenic animal embryo comprising the step of introducing a mariner-like element (MLE) containing a transgene into an animal embryo cell, optionally including the step of introduction of exogenous transposase protein, or a DNA or RNA sequence encoding a transposase. The resulting embryo may be used to generate further embryos or be allowed to develop into an animal. The invention is useful in introducing foreign DNA into selected animals.

Data supplied from the esp@cenet database --- Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P) (12) 公表特許公報 (A) (11) 特許出願公表番号
 特表2001-513336
 (P2001-513336A)

(43) 公表日 平成13年9月4日 (2001.9.4)

(51) Int.Cl. ¹ A 01 K 67/027 C 12 N 15/09	識別記号 F 1	テキスト (参考) 4 B 0 2 4 A
--	-------------	-----------------------------

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2000-507225(P2000-507225)	(71) 出願人 ロスリン インスティチュート (エディンバラ) 英國、イーエイチ25 9ビーエス スコットランド、ミドロチアン、ロスリン
(36) (22) 出願日 平成10年8月21日 (1998.8.21)	(72) 発明者 ヘレン サング 英國、イーエイチ25 9ビーエス ミドロチアン、ロスリン、ロスリン インスティチュート (エジンバラ)
(86) 翻訳文提出日 平成12年2月21日 (2000.2.21)	(72) 発明者 デイヴィッド ジョン フインガン 英國、イーエイチ8 9ワイエル エジンバラ、サウス ブリッジ、オールド カレッジ、ユニバーシティ オブ エジンバラ
(86) 國際出願番号 PCT/GB98/02517	(74) 代理人 弁理士 高橋 繼
(87) 國際公開番号 WO99/09817	
(87) 國際公開日 平成11年3月4日 (1999.3.4)	
(31) 優先権主張番号 9717913.9	
(32) 優先日 平成9年8月22日 (1997.8.22)	
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)	
(31) 優先権主張番号 9812822.6	
(32) 優先日 平成10年6月12日 (1998.6.12)	
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスジェニック動物の生産における「マリーナ」トランスポザンの使用

(57) 【要約】

トランスジェニック動物の胚を調製する方法であって、
 転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子 (MLE) を動物の胚細胞中に導入する工程を含み、そして外因性トランスポザーゼタンパク質、又はトランスポザーゼをコードするDNAもしくはRNA配列を導入する工程を任意選択可能に含んで成る方法。その結果得られる胚はさらなる胚を形成させるために又は動物に発育させるために使用することができる。本発明は、選択した動物に外来DNAを導入する上で有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物胚細胞中に、転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子（MLE）を導入する工程を含み、外因性のトランスポザーゼタンパク質又はトランスポザーゼをコードするDNA又はRNAの配列を導入する工程を任意選択可能に含んで成るトランスジェニック動物胚を調製する方法。

【請求項2】 前記動物が鳥類である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記動物が家禽、例えばガルス・ドメスティクスである、請求項2記載の方法。

【請求項4】 前記動物が有蹄類である、請求項1記載の方法。

【請求項5】 前記動物が雌牛又は雄牛、ヒツジ、ヤギ、水牛、ラクダ又はブタである、請求項3記載の方法。

【請求項6】 前記「マリーナ」一様因子がドロソフィラ・マウリティアナ由来の転移因子「マリーナ」である、請求項1～請求項5いずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 転移遺伝子を含む前記「マリーナ」一様因子がコンストラクト中の細胞内へ導入されるものである、請求項1～請求項6いずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 前記「マリーナ」一様因子（MLE）の導入が細胞質中への又は接合体の前核もしくは動物胚細胞の核中への電気穿孔又はリポソームを用いるMLEの注入によるものである、先行する請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子（MLE）を動物の成熟細胞中へ導入する工程を含み、外因性トランスポザーゼタンパク質又はトランスポザーゼをコードするDNAもしくはRNA配列の共一導入を任意選択可能に含んで成るトランスジェニック動物胚を調製する方法。

【請求項10】 転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子（MLE）を動物の胎児細胞中へ導入する工程を含み、外因性トランスポザーゼタンパク質又はトランスポザーゼをコードするDNAもしくはRNA配列の共一導入する工程を任意選択可能に含んで成るトランスジェニック動物胚を調製する方法。

【請求項11】 結果として得られる動物胚が、(i)転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子(MLE)の導入しそれを染色体中に挿入した後その細胞の核を取得する工程、及び(ii)その後にその核を除核された卵母細胞中に導入し、この細胞を動物胚に発育させる工程により調製されるものである、先行する請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 (a) 先行する請求項のいずれか1項に記載の胚を調製する工程、
(b) 該胚から分娩まで動物を発育させる工程、そして
(c) こうして形成された動物から任意選択可能に増殖させ
る工程、
を含んで成る動物を調製する方法。

【請求項13】 該動物胚が胚の完全発育の前にさらに操作されるものである、請求項12記載の方法。

【請求項14】 請求項12又は請求項13記載の方法により調製されるトランスジェニック動物。

【請求項15】 遺伝子の不存在又は遺伝子の突然変異により惹起される病的状態の治療における「マリーナ」一様因子の使用。

【請求項16】 遺伝子の不存在又は遺伝子の突然変異により惹起される疾病の予防又は治療用の薬剤の調製における「マリーナ」一様因子の使用。

【請求項17】 遺伝子の不存在又は遺伝子の突然変異により惹起される病的状態の治疗方法であって、転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子を動物細胞中に導入する工程を含み、トランスポザーゼタンパク質又はトランスポザーゼをコードするDNAもしくはRNA配列を導入する工程を任意選択可能に含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は動物の胚に転移遺伝子を導入する方法に関し、そしてそれからのトランスジェニック動物の調製に関する。

【0002】

新たな受精卵内に、その胚細胞の最初の卵割の前に、マイクロインジェクションにより外來性のDNAを導入する方法は、トランスジェニック動物の確立された生産方法となってきた。この外來性DNAは動物の染色体内に組み込まれ、そして創始動物であるトランスジェニック動物の子孫により安定な付加的配列として遺伝的に承継される。

【0003】

この染色体への組み込みが起こる頻度は種間で変動する。この頻度は注入の場所によっても影響される。このDNAが受精卵の前核の一つの中に導入されることは、トランスジェニック動物の生産の頻度は一般に高くなる。

【0004】

転移因子とは、生物のゲノム内の異なる部位に転移することができるDNAの配列と定義される。転移因子は、一つのゲノム部位から別のゲノム部位に移動するためにはメカニズムにより、幾つかの異なるクラスに分けることができる。転移因子の能力は、特定の種由来の転移因子をその種のゲノム中に外來遺伝子を導入するためのベクターとして使用することを可能とするように修飾されてきた。例えば、ドロソフィラ・メラノガスター由来のP因子はディー・メラノガスターを形質転換するために広く使用されている（ルービン、ジー、エム、及びスプラドリング、エイ、シー、*Science* 218 348-353 (1982)及びU.S.-A-4 670388）。

【0005】

新たな受精卵由来のニワトリ胚を培養して孵化したニワトリを生産する方法が発展し、それはEP-A-0295964及びペリー、エム、エム、*Nature* 331 70-72 (1988)に記述されている。続いて、ニワトリの接合体の細胞質内にDNAを注入する方法、すなわちジャーミナル・ディスクがサング、エイチ、エム、

及びペリー、エム. エム., Mol. Reprod. Development 1 98-106 (1989) 及びペリーら Roux's Archive of Developmental Biology 200 312-319 (1991)。トランスジェニック鳥の生産におけるこれらの技術の使用はラブら Bio/Technology 12 60-63 (1994) で報告された。しかしながら、トランスジェニック鳥の生産のためのこの手順を継続的に使用すると、得ることができるトランスジェニック鳥の頻度は、その子孫へ移転される外来性DNAの組み込みで判断すると、低い、すなわち生ニワトリ総数254からの、生殖系列トランスジェニック鳥は3羽であった。

【0006】

従って、この方法の効率は比較的低く、DNA注射後に孵化されたニワトリの僅か1%又はそれ未満しかそのゲノム中に注射されたDNAを組み込まなかった。さらに、これらのトランスジェニック鳥のそれぞれから1個のトランスジェニック系列しか得られなかった。すなわち、このトランスジェニック子孫は1個の染色体部位に外来性DNAを数コピー含むだけである。

【0007】

細胞質中へのDNA構築物の注入も、前核注射に比べると、哺乳動物では極めて非効率的である(プリンスターら Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82 4438-4442 (1985))。また、前核注射により生産された転移遺伝子の大部分は注射されたDNA構築物の多重コピーのアレーから成る。これらのアレーの構造は転移遺伝子の発現に対し負の効果を及ぼし得る、すなわち、発現のレベルを減少させあるいは発現の組織特異性に悪影響を与える。

【0008】

トランスジェニック鳥はレトロウイルスベクターの感染を用いても生産されてきた(ボセルマンら Science 243 533-535 (1989))。しかしながら、レトロウイルスベクターの使用は幾つかの不利益がある。家禽集団に広く拡がる野生型レトロウイルスとウイルスベクターの組換えの危険性は最も深刻な問題と考えられる。レトロウイルスベクターはそれを用いて作業するのに極めて複雑でありそして約8キロ塩基対より大きな構築物を組み込むことにその能力が制限される。

【0009】

転移因子「マリーナ」は最初ドロソフィラ・マウリティアーナのゲノム中で発見されたが、密接に関連する因子が脊椎動物及び無脊椎動物の両方の広範囲の種で発見されてきた（ロバートソン、エイチ、エム. *Nature* 362 241 (1993)）。それは、ライシュマニアなどの病原性生物を研究するためにも使用されてきた（グエイロスーエィルホ、エフ、ジェイ、及びビバリー、エス、エム. *Science* 276 1716-1719 (1997) 及びハートル、ディー、エル. *Science* 276 1659-1660 (1997)）。しかしながら、グエイロスーエィルホら及びハートルにより記述された「マリーナ」の使用は遺伝的道具としての使用、すなわち、挿入的突然変異誘発用に関連するもののみであり、そして遺伝子導入（transgenesis）又は突然変異誘発によりトランスジェニック動物を調製するための手段としての使用には関連しなかった。要するに、「マリーナ」はトランスジェニック動物の生産における役割について適当であるとは記述されず、そしてそのような使用は先行技術では決して期待されていないのである。

【0010】

驚くべきことに、「マリーナ」因子はトランスジェニック動物の調製におけるベクターとして使用することができるがここに発見されたのである。

【0011】

本発明の第1の側面によれば、転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子（MLE）を動物の胚細胞内へ導入する工程を含み、外因性トランスポザーゼタンパク質又はトランスポザーゼをコードするDNAもしくはRNA配列を導入する工程を任意選択可能に含んで成るトランスジェニック動物胚を調製する方法が提供される。

【0012】

トランスジェニックという用語は、本発明の文脈においては、外来性DNAの配列がトランスジェニック子孫動物の代々の世代へと譲渡されるように「マリーナ」一様因子（MLE）によって導入される外来性DNAの配列が動物染色体内に安定に組み込まれた動物を記述するために用いられる。このような状況では、最初のトランスジェニック動物は「創始」動物として知られる。この創始動物はその子孫が安定にこの転移遺伝子を遺伝的に承継するように、組み込まれた外来

性DNA又は転移遺伝子をその細胞のすべてに又は十分な割合で持っている。転移遺伝子がその動物の細胞の一部にだけ存在するときは、この動物はキメラと呼ばれる。本発明は安定に又は直接的に転移遺伝子を染色体中に組み込んでいる動物であってその子孫まで遺伝子を譲渡することなくその体細胞中に転移遺伝子を発現する動物にも広げられる。

【0013】

動物に関して「トランスジェニック」という用語は、別の種由来の一つ以上の遺伝子をその生殖系列中に含む動物を指すことに限定するものと解すべきでない。ただし、多くのトランスジェニック動物はそのような遺伝子又は遺伝子群を含むであろうが。むしろ、この用語は、もっと広く、その生殖系列が「マリーナ」一様因子（MLE）の導入の対象となったすべての動物を指すのである。そうであるから、例えば、その生殖系列において内因性遺伝子が欠失、重複、活性化、又は修飾されてしまった動物は、外因性DNA配列がその生殖系列に付加された動物と同様に本発明の目的にとってトランスジェニック動物である。

【0014】

原理的には、本発明は、鶏などの鳥類、両生類及び魚類を含むすべての動物に適用可能である。しかしながら、実用的には、最大の商業的に有用な適用可能性が現在予想されるのは、非ヒト動物（温血脊椎動物）、特に（非ヒト）哺乳動物、特に胎盤哺乳動物、そして鳥、特に家禽に対するものである。この発明が最も有用であるように思われるには、有蹄類、牛、ヒツジ、ヤギ、水牛、ラクダ及びブタなどの特に経済的に重要な有蹄類についてである。鳥類の中では、本発明は、鶏、ガルス・ドメスティクス、七面鳥及びホロホロチョウなどの家禽に対する特別な適用を有する。本発明は、例えば、馬、ラマ又はラット、マウス又はウサギなどのげっ歯類のような他の経済的に重要な動物種に適用可能である。

【0015】

本発明の方法は動物胚細胞内への外来性DNA又は転移遺伝子の導入に直接向けられる。この胚細胞は接合体段階である受精直後の単一細胞段階にあるものでよい。しかしながら、その導入は胚発育の後期の段階、例えば、2-細胞、4-細胞、8-細胞、16-細胞、32-細胞、又は64-細胞段階の胚からの、又

はさらに後の段階からの胚細胞内へのものでもよい。このような後期段階胚から作成された創始動物であるトランスジェニック動物は、従って、キメラであることがあるが、その子孫から全ての細胞中に転移遺伝子が存在するものを選択することが可能である。

【0016】

「マリーナ」一様因子はドロソフィラ・マウリティアーナ由来の転移因子「マリーナ」であることもあり、又は別の脊椎動物もしくは無脊椎動物種由来の近縁の因子であってもよい（ロバートソン、エイチ、エム、*Nature* 362 241 (1993)）。

「マリーナ」一様因子は、便宜的に、染色体変更の対象となる動物の細胞から誘導することもできる。「マリーナ」一様因子のスクレオチド配列は、細胞内に導入されるとき転移因子として働くその能力によって規定することができる。

【0017】

「マリーナ」一様転移因子は約36 bpの末端の逆方向反復を持つ約1, 300 bp長のものである。「マリーナ」一様因子はそれぞれ、トランスポザーゼと推定されるポリペプチドであって、他の「マリーナ」一様因子がコードするポリペプチドと平均して34%のアミノ酸配列同一性を持つポリペプチドをコードする。すべての「マリーナ」一様因子の推定的トランスポザーゼのアミノ酸配列はD、D34Dとして知られる特徴的なモチーフを含む。ここで、「D」はアスパルギン酸残基を表す。このモチーフの第3のアスパラギン酸の直ぐ後にチロシン残基がくる（ロバートソン、エイチ、エム、*J. Insect Physiol.* 41 99-105 (1995)）。

【0018】

転移遺伝子は「マリーナ」一様因子内では「マリーナ」配列内のどの位置にても含まれることができる。理論にとらわれることなく、「マリーナ」一様因子のそれぞれの末端の最後のほぼ100塩基がMLEの機能にとってそして細胞染色体中へのその組み込みにとって重要であると信じられている。こうして、転移遺伝子は、それぞれの末端からほぼ100塩基以内を除き、MLE内のどこにでも配置されうる。転移遺伝子はMLEの中央の配列を置換してその因子の末端のみが残っているものを生ずることもできる。

【0019】

「マリーナ」一様因子内に含まれる転移遺伝子配列は望ましい外来遺伝子配列のいかなるものでもよい。特に好ましい遺伝子配列としては、酵素、ホルモン又は他の機能的に活性なタンパク質、例えば、免疫グロブリン、ヘモグロビン、ミオグロビン、チトクローム等の治療上有用なタンパク質をコードする遺伝子配列が挙げられるが、これらに限定されない。他の遺伝子配列は、その遺伝子が存在しないか又は突然変異しており対応するタンパク質が生産されず又は活性型で生産されないタンパク質をコードすることができる、すなわち、囊胞性腺維症又は筋ジストロフィーなどの疾病状態の原因となる遺伝子である。

【0020】

転移遺伝子配列が、動物の乳の分泌のための乳腺などの選択された組織中に、卵黄もしくは卵のアルブミン中に、又は血液中に転移遺伝子の発現を指示するためのプロモーター配列を含むことは一般的である。さらなる適用では、トランスジェニック宿主動物の器官を、その細胞内で発現する免疫タンパク質に対し同種異系である受容体中への異種移植に使用できるように免疫拒絶を制御する調節タンパク質の発現を含んでいる。同様に、同種移植も含まれる。

【0021】

農業への適用では、本発明の方法は改良された農場動物を生産するために使用することができる。動物中に導入される転移遺伝子としては、疾病抵抗性遺伝子、生長促進性遺伝子、又は特定の性質に改良された特徴を付与しもしくは新規な性質を導入する遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0022】

「マリーナ」一様因子（M L E）の導入は、細胞質中へ又は接合体の前核もしくは動物胚細胞の核中へMLEを注入することにより便宜的に達成することができる。電気穿孔又はリポソームなどの、導入の他の経路も本発明の方法に同様に効果的であり、使用することができる。

【0023】

このMLEは「マリーナ」一様因子のDNA配列及び望ましい転移遺伝子を含む構築物の形で導入することができ、あるいは単に「マリーナ」一様因子のヌク

レオチド配列と望ましい転移遺伝子それ自体を導入することもできる。ベクター系導入法が用いられる場合、構築物はプラスミド、コスミド又は酵母人工染色体（YAC）もしくは細菌人工染色体（BAC）などの人為的染色体であってもよい。この構築物は、必要なときは、導入される外来DNAに応じて、プロモーター又はエンハンサーなどの付加的な調節配列を含んでいてもよい。従って、本発明のさらなる側面は上述の転移遺伝子をふくむ「マリーナ」一様因子を含む構築物又はベクターである。一般に、MLEは転移遺伝子の操作及びクローニングのし易さの観点からプラスミド中にクローニングされる。転移を促進するためDNAがスーパーコイルとなるようにMLEベクターを環状分子にすることも好ましい。

【0024】

本発明の方法は、「マリーナ」一様因子の導入の時に、又はその少し前又はその少し後に、外因性トランスポザーゼタンパク質、又はトランスポザーゼをコードするDNAもしくはRNA配列を導入する付加的な任意選択可能な工程を含んでもよい。

【0025】

細胞内に導入される「マリーナ」一様因子及びトランスポザーゼは同一動物種由来でも異なる種由来のものでもよい。

【0026】

本発明の第2の側面によれば、転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子（MLE）を動物の成熟細胞中に導入する工程を含み、外因性トランスポザーゼタンパク質又はトランスポザーゼをコードするDNAもしくはRNA配列を導入する工程を任意選択可能に含んで成るトランスジェニック動物胚を調製する方法が提供される。

【0027】

本発明の第3の側面によれば、転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子（MLE）を動物の胎児細胞中に導入する工程を含み、外因性トランスポザーゼタンパク質又はトランスポザーゼをコードするDNAもしくはRNA配列を導入する工程を任意選択可能に含んで成るトランスジェニック動物胚を調製する方法が提供

される。

【0028】

本発明の第1、第2及び第3の側面に記載の方法のいずれか一つにおいて、その結果得られる動物胚は(i)転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子の導入そして染色体中へのその挿入の後、その細胞の核を取り出す工程、そして(ii)統いて、その核を除核卵母細胞中へ導入しそれを動物胚に発育させる工程により調製することができる。核転移技術を用いる動物胚の調製を記述した幾つかの方法があり、そして好ましい技術としては、WO-A-9607732、WO-A-9707669及びWO-A-9707668に記述されたものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0029】

上述の発明の方法では、核は供与細胞から受容細胞へ転移される。この方法の使用は特定の供与細胞型に限定されない。供与細胞は、ウイルマットら *Nature* 385 810 (1997)、キャンベルら *Nature* 380 64-66 (1996)、又はシベッリら *Science* 280 1256-1258 (1998) に記述されているようなものである。核転移に使用して成功し得る胚細胞、胎児細胞及び成熟体細胞を含む正常な核型の細胞はすべて、原理的には本発明の方法に用いることができる。胎児纖維芽細胞は特に有用な供与細胞のクラスである。一般に適する核転移の適当な方法は、キャンベルら *Theriogenology* 43 181 (1995)、コラスら *Mol. Reprod. Dev.* 38 264-267 (1994)、キーファーら *Biol. Reprod.* 50 935-939 (1994)、シムズら *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90 6143-6147 (1993)、WO-A-9426884、WO-A-9424274、WO-A-9807841、WO-A-9827214、WO-A-9003432、U.S.-A-4994384及びU.S.-A-5057420に記述されている。従って、本発明は、完全に分化した細胞を含む少なくとも部分的に分化した細胞の使用を予定する。供与細胞は培養細胞でもよいが、これに限られる必要はなく、静止細胞でもよい。静止している核の供与細胞は静止に入るように誘導され得る細胞又はイン・ビボで静止状態で存在する細胞である。培養された牛の一次纖維芽細胞、胚由来のヒツジ細胞系(TNT4)、6歳の成熟ヒツジからのヒツジ乳上皮細胞由来の細胞系(OME)、ヒツジ胎児組織由来の纖維芽細胞の細胞系(BLWF1)及び9

日齢ヒツジ胚由来の上皮一様細胞系（S E C 1）がWO-A-9707669 及びWO-A-9707668 に記述されている。T N T 4 細胞系を含む本発明に有用な胚由来の細胞系の1クラスがWO-A-96/07732に記述されている。培養された内部細胞マス（C I C M）細胞はWO-A-9737009 及びWO-A-9827214 に記述され、そして胚細胞系又は幹一様細胞系はWO-A-9807841 に記述されている。核供与体として使用するためのトランスジェニック牛の纖維芽細胞はザワダら（Nature Medicine 4(5) 569-574 (1998)及びシベッリら（Science 280 1256-1258 (1998)に記述されている。

【0030】

供与細胞が静止していると記述される場合、このような細胞は分裂細胞周期により活発に増殖していることはないであろう。静止供与細胞の使用はWO-A-9707669 に記述されている。分裂細胞周期には四つの異なる相、すなわち、G 1 、S 、G 2 及びMがある。細胞周期における開始の事象は「開始点（細胞周期の）」と呼ばれ、G 1 相で起こり、そしてユニークな機能を持っている。別の細胞周期を受けようとする決定又は約束は「開始点」でなされる。一旦細胞が「開始点」を通過すると、それは前一DNA合成相である、G 1 相の残りを通過する。第2の段階であるS相はDNA合成が起こる相である。この相の次にDNA合成と有糸分裂の間の期間であるG 2 相が来る。有糸分裂それ自体はM相で起こる。静止細胞（静止が誘導された細胞並びにある種の完全に分化した細胞などの自然状態で静止している細胞を含む）は一般にこの周期の四つの相のいずれにも存在しないものとみなされる。これらの静止細胞は、これらがこの周期を通って正常に進行しないことを示すために、G 0 状態にあると通常記述される。静止G 0 細胞の核は内容物として二倍体DNAを持っている。

【0031】

培養細胞は、化学的処理、栄養枯渇、成長阻害又は遺伝子発現の操作などを含む種々の方法により静止状態に入るように誘導することができる。今日では、培養培地中の血清レベルの減少を用いて、ヒツジ及び牛両方の細胞系で静止を誘導するのに成功している。この状況では、細胞はG 1 相の間の成長周期を出て、上に説明したように、いわゆるG 0 段階に置かれている。このような細胞は再び刺

激され成長周期に再突入するときまで、数日間（おそらく細胞によってはもっと長く）この状態に留まることができる。G0状態に置かれた静止細胞は二倍体である。このG0状態は、細胞がそれから分化することができる細胞周期の中の重要な点である。静止の際に、幾つかの代謝的変化が報告されており、これらには、モノリン酸化ヒストン、纖毛中心粒、全てのタンパク質合成の減少又は完全停止、タンパク質分解の増加、転写の減少及び総細胞RNAの減少をもたらすRNAの代謝回転の増加、ポリリボソームの分解、不活性80Sリボソームの蓄積及びクロマチン縮合が含まれる（ホイットフィールドら、Control of Animal Cell Proliferation, 1_331-365 (1985)）。

【0032】

これらの特徴の多くは、除核卵母細胞に核を移転した後に起こるために要求される特徴である。G0状態が細胞の分化と関連しているという事実は、これが受容体細胞の細胞質による改造及び／又は再プログラミングをより受け易い核／クロマチン構造を提供することを示唆する。このようにして、静止状態にある核供与体のお蔭で、核が発育を指示することができるよう胚の再構成又は再構築の前に供与体の核のクロマチンが修飾されうるのである。これは、供与体細胞のクロマチンが核供与体として細胞が使用する前に修飾されるという点で、従来報告された核の転移方法のいずれとも異なっている。

【0033】

供与体細胞からの核がそれに転移される受容体細胞は卵母細胞又は別の適当な細胞であります。受容体卵母細胞の好ましいクラスはWO-A-9707668に記述されている。

【0034】

中期Iにある卵母細胞から、中期IIにある卵母細胞を経て、接合体及び2細胞胚までの、種々の異なる発育段階にある受容体細胞が使用されうる。それぞれは、その利点および不利益を持っている。受精卵の使用は効率的な活性化を保証するが、卵母細胞については単為発生の活性化が必要となる（後記参照）。一部の種では、卵割一段階の胚の使用を有利にする別のメカニズムは、遺伝子発現の再プログラミングが必要となる程度である。マウスでは、複写は第2細胞周期の間

に開始され、そして合成されるタンパク質の性質の大きな変化は、胚懸胞の段階まで二次元電気泳動では認められない（ハウレット及びボルトン J, *Embryol. Exp. Morphol.* 87 175-206 (1985)）。そうはいっても、多くの場合、受容体細胞は卵母細胞である。

【0035】

受容体は除核されていることが好ましい。核転移手順における受容体卵母細胞の除核は必須であると一般に考えられてきたが、この判断の実験的確認は公表されていない。有蹄類に対して記述された最初の手順は、細胞を2個の1/2細胞への分割を含み、その一つは除核されていたようであった（ウイラドセン *Nature* 320 (6) 63-65 (1986)）。この手順は、他方の未知の1/2細胞がなお中期の組織を持ちそして細胞質の容積の減少が新たな胚の分化のパターンを加速すると考えられるという不利益を持っている（エヴィスコフら, *Development* 109 322-328 (1990)）。

【0036】

より最近になって、最少量の細胞質を含む染色体を除去する試みの中で、異なる手順が用いられてきた。第1の極体と近くの細胞質の吸引により、ヒツジ卵母細胞の6.7%で中期II組織を除去することが見出された（スミス及びウイルマット *Biol. Reprod.* 40 1027-1035 (1989)）。DNA特異的蛍光色素（ヘキスト33-342）を使用した場合のみ、除核の際、細胞質容量の最少の減少を保証する方法が提供された（ツノダら, *J. Reprod. Fertil.* 82 173 (1988)）。家畜類では、これはおそらく現在日常的に使用される方法となっている（プラザー及びファースト *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 41 125 (1990)、ウェススシンら *Biol. Reprod. (Suppl.)* 42 176 (1990))。

【0037】

哺乳動物での除核への非侵襲的取り組みについての報告は極めて少ないが、両生類では日常的手順として紫外線照射が用いられている（ガードン、キュー、J. *Microsc. Soc.* 101 299-311 (1960)）。DNA特異的蛍光色素の使用の過程で、マウスの卵母細胞を30秒より長く紫外線に曝すと細胞の発育能力を低下させたことに注目された（ツノダら, *J. Reprod. Fertil.* 82 173 (1988)）が、哺乳動

物でのこのアプローチの使用についての詳細な報告はない。

【0038】

本発明の第4の側面によれば、動物を調製する方法であって、

- (a) 本発明のこれまで記載した側面のいずれかの胚を調製する工程、
- (b) 前記胚から分娩まで動物を発育させる工程、及び
- (c) このようにして形成された動物から任意選択可能に増殖させる工程、

を含んで成る方法が提供される。

【0039】

本発明のこの側面に従って調製された動物の胚は、胚の完全発育の前に、さらに操作することができる。これは、付加的遺伝物質の導入又は特定の遺伝的特性もしくはある遺伝子の有無のためのその胚の検定を含む。胚の細胞が分娩まで発育させられる二以上の胚を調製するために使用される場合には、その胚から二以上の動物を誘導することができるということもあり得る。

【0040】

従って、本発明は、本発明の第4の側面に記載の方法により調製される動物にも及ぶ。

【0041】

本発明の第5の側面によれば、遺伝子の不存在又は遺伝子の突然変異により惹起される疾病状態の治療における「マリーナ」一様因子の使用が提供される。本発明のこの側面は遺伝子の不存在又は遺伝子の突然変異により惹起される疾病状態の予防又は治療のための薬剤の調製における「マリーナ」一様因子の使用にまでも拡張される。このような治療方法は転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子の動物細胞中の導入を含みうる。トランスポザーゼタンパク質、又はトランスポザーゼをコードするDNAもしくはRNA配列も導入される場合には、この工程はMレ Vの導入と同時に、連続して又は別々に行われうる。

【0042】

従って、本発明は、遺伝子の不存在又は遺伝子の突然変異と関連する疾病状態の治療に胚の細胞が用いられる本発明のこれまで記載の側面のいずれか一つに記載の胚の調製にも及ぶ。このような細胞は、患者の細胞がもはや活性でなく、有

効でない疾病状態、特に神経障害又はホルモン障害を治療するために使用することもできる。

【0043】

第2及びその後の側面にとっての好ましい特徴は、必要な変更を加え、第1の側面にとってのそれと同様である。

【0044】

実施例1：トランスポザーゼの調製

以下の実験に使用する「マリーナ」トランスポザーゼは、プラスミド p B C P M o s 1 を保持する大腸菌株 B L 2 1 D E 3 (ステウディアラ, Methods in Enzymology 185: 60-89 (1991)) から精製した。これは発現ベクター p B C P 3 6 8 から誘導した (ヴェルテロップラ Gene 153: 63-65 (1995))。因子M o s 1 由来の「マリーナ」トランスポザーゼの完全コード配列を p B C P M o s 1 の N d e I 部位に挿入した。これらの細胞を軌道振盪機 (200 rpm, 37°C) 上、ルーリアプロス (LB) 中で O D₆₀₀ が 0.8 になるまで成長させ、この時点で I P T G を 0.5 mMまで添加して細胞を 2 時間誘導させた。誘導の後、細胞を収穫し、必要になるまで -20°C で貯蔵した。1 リットル培養からのペレット状の細胞を 5 ml の 50 mM のトリス-塩酸 (pH 7.5)、10% グリセロール、2 mM の M g C l₂、1 mM の D T T に再懸濁した。0.1 mg/ml の濃度までリゾチームを添加し、そして細胞を室温で 5 分間インキュベートした。ついで、2.5 mM のトリス-塩酸 (pH 7.5)、4 mM の E D T A、0.2 M の N a C l、1% デオキシコール酸塩、1% の N P 4 0、1 mM の D T T を含む洗剤緩衝液を 1.0 ml 添加することにより細胞を溶解し、そしてさらに 1.5 分間室温でインキュベートした。2000 ユニット/ml の DNアーゼ I の 100 μlと共に M g C l₂ を最終濃度 1.0 mM になるまで添加した。抽出物を粘性が減少するまでピペットで数回上下させ、ついで室温に 10 分間放置した。次いで、全細胞抽出物を 20,000 g で 30 分間遠心分離した。そのペレットを 0.5% N P 4 0 (v/v)、1 mM の E D T A 中で 3 回洗浄した後、6 M 尿素中で 1 回洗浄し、最後に 1 ml の 2.5 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、6 M グアニジン塩酸、5 mM の D T T 中に再懸濁した。13,000 g で 10 分間遠心分離した後、そ

の上清を2.5 mMトリス一塩酸(pH 7.5)、8 M尿素、5 mMのDTT、10%のグリセロール緩衝液中に100倍希釀し、50 mMのNaClを補充した同じ緩衝液で予め平衡化した2 mlファスト・フローCMセファロース・カラム(シグマ)上に載せた。

【0045】

これらの条件の下で、変性した「マリーナ」トランスポザーゼはこのカラムに結合した。タンパク質は1 ml/分の速度で8~0 M尿素の200 ml直線勾配を通過させることによりそのカラム上で再生された。再生の後、結合したタンパク質をバッファーA(20 mMのトリス一塩酸(pH 7.5)、1 mMのDTT、10%のグリセロール)中の50 mM~1.0 MのNaCl直線勾配の20 mlで溶出した。「マリーナ」トランスポザーゼを含む画分はSDS-PAGEで確認し、セントリコン(アミコン)カラム(30 K分子量カットオフ)を通す回転によりさらに濃縮した。このタンパク質を約0.25~0.5 mg/mlの濃度で凍結貯蔵した。

【0046】

実施例2：ニワトリ胚中への「マリーナ」の注入

「マリーナ」因子を含むプラスミドMo s 1(メドホラら *Genetics* 128:311-318 (1991))を、サング及びペリー(Mol. Reprod. Dev. 1:98-106 (1989))が記述したように、5 mMの酢酸マンガンを含む又は含まない、100 mMのNaCl、2.5 mMのヘペスpH 7.7、2 mMのジチオトレイトール、5% (v/v)グリセロール、2.5 μg/mlの牛血清アルブミンを含む緩衝液中、0.05~0.005 mg/mlの濃度の精製「マリーナ」トランスポザーゼと共に、2.5 μg/mlの濃度でニワトリ胚中に注入した。注入した胚をペリー(Nature 31:70-72 (1988))が記述したように培養した。「マリーナ」配列を含む細胞を持つ孵化した雛は、「マリーナ」に特異的なプライマー及び孵化中の雛の漿尿膜から調製したDNAを用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことにより同定した。実験中に死んだが、注入後少なくとも12日間生存した胚も「マリーナ」配列の存在について分析した。

【0047】

実施例3から8：材料及び方法：プラスミド構築物及びトランスポザーゼタンパク質の調製

プラスミドpMos1TetはpMos1中の「マリーナ」のオープンリーディングフレーム中に存在するユニークSal I部位中にテトラサイクリン耐性遺伝子を挿入することにより構築した。Tet^r遺伝子はAva I及びEco RIでpBR322を消化することにより得た。pMos1はSal Iで線状化しそして末端を満たすためクレノウポリメラーゼで処理した後この二つの断片を連結した。組換え体—誘導「マリーナ」トランスポザーゼの発現及び調製は他の場所（エイ、ドーソン及びディー、フィンガン、準備中）で詳細に記述されるであろう。簡単に述べれば、pMos1由来の「マリーナ」トランスポザーゼ遺伝子を発現ベクターpBCP368（ウェルテロップラ Gene 153_63-65 (1995)）に挿入し、pBCPMos1を構築した。この構築物を大腸菌株DH5 α 中に転移させ、そしてタンパク質発現の誘導の後、細胞を収穫した。このトランスポザーゼタンパク質は、不溶性の沈殿物として回収され、可溶化され、そしてファスト・フローCMセファロースカラム（シグマ）に結合させた。このタンパク質は8M尿素中で再生させそしてイン・ビトロ転移検定法でその活性を測定した。

【0048】

ミクロ注入及び雛胚の培養

雛胚の培養は、（ラブら Bio/Technology 12 60-63 (1994)）に注記された修正を施し、実質的には（ペリー、Nature 331 70-72 (1988)）が記述したとおりに行った。2.5 μ g/m1の濃度の無切断プラスミド1～2n1を、確立された手順（ラブら Bio/Technology 12 60-63 (1994)）に従って、接合体の卵核ディスク（germinal disc）中に注入した。このDNAを転移緩衝液（100mMのNaCl、2.5 mMのヘペスpH 7.9、2 mMのジチオトレイトル、5.0 mMの酢酸マンガン、2.5 μ g/m1のBSA、5%のグリセロール）中で希釈し、必要なときは、トランスポザーゼタンパク質を1.5 n g/m1の濃度まで添加した。

【0049】

PCR分析

組織試料（漿尿膜、肝臓及び生殖腺）は12日間以上インキュベートした後に

培養中に死んだ胚から切り取り、そしてDNAはピュアジーン（フローゲン）ゲノミックDNA精製キットを用いて抽出した。ゲノムDNA試料は生存している雛の孵化中の漿尿膜から取得し、血液試料はより成熟した（older）ニワトリから取得しそして精液は成熟おんどりから得た。PCR分析は「マリーナ」因子及びpBluescript（pMos1実験）又はTet^r遺伝子及びベクタークロラムフェニコール（CAT）耐性遺伝子（pMos1Tet実験）の存在を調べるため0.5～1μgのDNA試料について行った。コピー数を推定するため、対照のPCR反応を、既に記述された（ラブら Bio/Technology 12 60-63 (1994)）ように、1個のコピー遺伝子（1×）、10倍希釈（0.1×）及び100倍希釈（0.01×）の量と当量になるように添加したpMos1又はpMos1Tet DNAと共に雛のゲノムDNAの1μg部分について平行して行った。使用したプライマーは、

(i) 「マリーナ」

+	5' - T C A G A A G G T C G G T A G A T G G G
-	5' - A A A T G A C A C C G C T C T G A T C C

(ii) pBluescript

+	5' - G C A G A G C G A G G T A T G T A G G C
-	5' - A G C C C T C C C G T A T C G T A G T T

(iii) Tet^r

+	5' - C T T G A G A G C C T T C A A C C C A G
-	5' - T T T G C G C A T T C A C A G T T C T C

(iv) CAT

+	5' - A A A A T G A G A C G T T G A T C G G C
-	5' - A G G T T T T C A C C G T A A C A C G C

である。PCR産物は1.5%アガロースゲル上で分析し、構築物配列のコピー数は対照反応との比較により推定された。

【0050】

サザン転移分析及び組み込まれた「マリーナ」因子の単離

PCRによってトランスジェニックとして同定されたG₁ 雜からのDNAは、

*Bam*H I + *Hind*III 及び *Eco*R I で消化し、1%アガロースゲルで電気泳動しそしてハイボンドN（アマシャム）に転移させた。「マリーナ」一特異的プローブはこの因子の両末端に近いプライマーを用いるPCRにより形成させそしてランダムープライミングにより標識化した（レディプライム、アマシャム）。*Eco*R I で消化したG1 雜13からのDNAの0.1 μg部分をラムダZa pII・*Eco*R I -カット・アームズ（ストラタジーン）の1 μgに連結し、ギガパック・ゴールド（ストラタジーン）でパッケージした。約250,000個のplaquesをプレートに播き、そして「マリーナ」一特異的プローブでスクリーニングした。一つの陽性plaquesを固定し、精製し、そしてストラタジーン・プロトコールに従ってプラスミドとしてその挿入体を回収した。このクローン、pZap13は、*Eco*R I で消化し、その挿入体のサイズを雑13のゲノムDNA中に存在する「マリーナ」にハイブリダイズする断片と比較し、約8kb断片と共に移動することが見出された。このpZap13クローンは、この因子の両端を含み隣接するゲノムDNAにはいる所まで配列決定するように設計された「マリーナ」の5'及び3'末端近くのプライマー、すなわち、

左末端プライマー 5' - T C G G C A C G A A A C T C G A C A T G

右末端プライマー 5' - G C A A A T A C T T A G A A T A A A T G

を用いて配列決定された。

【0051】

実施例3：「マリーナ」プラスミドの注入後の雑胚の分析

確立された手順を用いて雑接合体中に活性な「マリーナ」因子Mo s 1（図1(a)）（メドホラら Genetics 128:311-318 (1991)）を保持するプラスミドを注入する一連の実験を行った。精製した「マリーナ」トランスポザーゼタンパク質はその注入の約半分に含まれていた。総数97の接合体に注入し、51はプラスミド+トランスポザーゼタンパク質を注入した。DNAは、少なくとも12日のインキュベーションの間生存したが孵化の前に死んだ胚の組織から、そして孵化した雑の漿尿膜から抽出した。これらのDNA試料を「マリーナ」因子(MAR)とプラスミドベクター(PBS、図1(a))を同時に検出するためPCRで分析した。「マリーナ」配列とプラスミドベクター配列のコピー数は存在する

雛ゲノムDNAの量に関して推定された、すなわち、1コピー（ゲノム当量当たり1コピー又はそれ以上）、ゲノム当たり0.05～0.5コピーそしてゲノム当たり0.05コピー未満。操作された胚の中の44が少なくとも12日のインキュベーションの間生存し、pMoss1+トランスポザーゼタンパク質の注入後23日間生存した。

【0052】

pMoss1をトランスポザーゼタンパク質を加え又は加えずに注入した後の「マリーナ」及びプラスミドベクターの存在についてのPCR分析の結果は表1に示してある。これらの結果は、リゾチーム遺伝子由来の標準遺伝子構築物（エイ、シャーマン、未発表データ）の注入により得られた結果と比較して図1Bにグラフ的に示してある。pMoss1の注入後に「1コピー」胚が見出される頻度はリゾチーム構築物実験におけるよりも劇的に高くなった。リゾチーム実験で得られた胚の1%未満は、構築物中のゲノム当たり1コピー当量でみるとpMoss1を注入された胚の27%に相当するレベルで構築物を含んでいた。トランスポザーゼを加え又は加えずに注入した胚の分析から得られた結果は極めてよく似ている（表1、図1（b））。このことは、PCR分析で検出された「マリーナ」配列が転移の結果として存在するならば、そのときは、転移は外因性トランスポザーゼタンパク質の不存在で起こることができるに違いないということを示す。

【0053】

【表1】

組み換体誘導トランスポザーゼタンパク質を加え又は加えずに pMoss1 を注入した後に発育した胚及び雛からの DNA の PCR 分析

ゲノム当量*	0 < 0.05		0.05 - 0.5		1 (+)		総数
	M A R *	P B S *	M A R	P B S	M A R	P B S	
トランスポザーゼ無添加	10(48%)	19(90%)	6(28%)	2(10%)	5(24%)	0	21
トランスポザーゼ添加	5(22%)	19(83%)	11(48%)	3(13%)	7(30%)	1(4%)	23
総数	15(34%)	38(87%)	17(39%)	5(11%)	12(22%)	1(2%)	44

* = プラスミドコピー数の推定は「材料及び方法」で説明する。

a = 配列特異的プライマーを用いる PCR

b = プラスミドベクター配列特異的プライマーを用いる PCR

【0054】

これらの胚試料について、pMoss1 のプラスミドベクターが存在するか分析した。トランスポザーゼタンパク質を加え又は加えずに pMoss1 を注入した後分析した 29 の胚、これらはゲノム当たり 0.05 コピー以上と推定されたレベルで「マリーナ」を含んでいた、のうち、6 個 (21%) がプラスミドベクター配列をも含んでいた（表 1）。残りの胚には「マリーナ」が存在していたが検出

可能なプラスミドベクター配列が欠如していたということは、pMo s I中の「マリーナ」因子は、プラスミド構築物からもしかすると雛のゲノムDNA中に転移したことを示唆するものであった。

【0055】

実施例4：「マリーナ」の生殖系列伝達

上記の実験で得られた3羽の雛は性的成熟に至るまで生存した。1羽の雛は孵化時にpMo s Iについてトランスジェニックではないかと同定された。「マリーナ」配列とプラスミドベクター配列は両方とも漿尿膜試料からのDNA及び血液試料からのDNAでPCRにより検出され、そのコピー数は0、1~0、5ゲノム当量であった。この評価は、このおんどりが性的成熟に達した時、精子試料の分析により確認された。このおんどりは家畜めんどりと交配され、子孫を孵化され、トランスジェニック雛の検出のためスクリーニングされた。総数93羽のG₁雛をスクリーニングし、その中の27羽(29%)が「マリーナ」に対するトランスジェニックであるとPCRにより同定された。

【0056】

G₀おんどりの生殖系列への「マリーナ」挿入の頻度及び起こった異種転移事象の数を求めるため、G₁雛のそれぞれを分析した。23羽の雛からのゲノムDNA試料をサザンプロットにより分析して「マリーナ」の挿入を含んだ制限断片の数とサイズを求めた。このゲノムDNA試料を「マリーナ」それ自体の内部を切断しない制限酵素であるBamHI及び HindIIIで消化し、「マリーナ」-特異的プローブ(図2(a))とハイブリッド形成をさせた。これも「マリーナ」内部を切断しない、さらなる制限酵素EcoRI(図2(b))を用いる分析により、異なるG₁雛の中に存在する幾つかの「マリーナ」-ハイブリダイジング制限断片を決定することができた。それぞれのG₁雛は、BamHI/HindIII及びEcoRI、「マリーナ」-ハイブリダイジング制限断片のサイズにより分類された(表2)。「マリーナ」を含む6個の異なる断片が同定された。それぞれの1例は図2(a)及び(b)に示してある。3個の断片(表2、図2(a)及び(b)、レーン7)は最も普通であり、そして親のおんどり中に明らかに存在していた(図2(a)及び(b)、レーン8)。G₁雛の中の3羽は

「マリーナ」と同様にプローブベクター配列を含むことがP C Rにより確認された。サザン転移分析（例えば、図2 (a) 及び (b)、レーン1）はそれらが5 k b (B a m H I / H i n d III 消化物) 又は8 k b (E c o R I 消化物) の制限断片を含むことを示した。この観察は、これらのトランスジェニック鳥が完全なp M o s 1 プラスミドの多重コピーの組み込みの結果として生じたということを示している。そしてそれは、P C RによりG₀ おんどり由来のゲノムD N A試料中にプラスミドベクター配列が検出されたことを説明する。G₁ 雉由来のゲノムD N Aの分析により、「マリーナ」が発育の初期段階でp M o s 1からG₀ おんどりの染色体中へ転移したこと、そして多重転移事象が起こったことが示唆される。

【0057】

【表2】

「マリーナ」ヘアハイダイギング制限断片の推定されたサイズ
及G₀ G₁トランスジェニック鳥におけるその頻度

図2 (a)/(b)	制限断片サイズ (k b)		G ₁ における頻度
	B a m H I	E c o R I	
2	8	8, 2	1
2	4	> 12	1
3	> 12	> 12	1
4	1, 7	4, 7	17
5	5, 1	> 12	9
6	10, 2	6	5

【0058】

実施例5：雛ゲノム中への「マリーナ」の転移

「マリーナ」にハイブリダイズする制限断片が雛ゲノムDNA中に組み込まれた「マリーナ」のコピーに実際に相当することを明らかにするため、「マリーナ」の1コピーを含む制限断片を1羽のG. 雉(雛13、図2(b), レーン2)のゲノムDNAからクローニングした。雛13由来のEcoRI断片のライブラリーを構築し、「マリーナ」プローブでスクリーニングした。図2(b), レーン2の低い方のバンドに相当する8.2kb断片を含むクローンを単離した。このクローン、pZAP13は、図2(b)に示されたサザンプロットを再調査するため使用した(図3(a))。このプローブにより、野生型雛由来のDNAを含む、全てのニワトリのゲノムDNA試料中から一連のEcoRI制限断片が同定された(図3(a), レーン9)。「マリーナ」ハイブリダイジング断片もかすかに検出可能である。このクローンも、挿入された「マリーナ」因子が完全なときはその両端をおおう配列をプライムするように設計された「マリーナ」の両端の内部のプライマーを用いて、DNA配列決定により分析した。生成した配列(図3(b))は「マリーナ」因子の両端の配列に完全に対応するが、pMOS1中のこの因子に隣接するドロソフィラ・ゲノムDNAとは異なる配列が両側に隣接する。ニワトリのDNA中に存在するこの因子にはTAジヌクレオチド反復が隣接し、この配列は「マリーナ」トランスポザーゼにより媒介される転移によって特徴的に形成される。これらの結果は「マリーナ」がpMOS1からの転移によってニワトリの染色体DNA中に組み込まれたことを示す。

【0059】

実施例6：トランスポザーゼ機能の起源

接合体注入実験においてpMOS1プラスミドにトランスポザーゼタンパク質の付加が転移にとって必要であるという証拠は存在しなかった(図1(b)及び表1)。トランスポザーゼ活性は、MOS1トランスポザーゼ遺伝子の発現又はニワトリ接合体中に存在する内因性活性によるものであったであろう。これらの可能性の間を区別するため、「マリーナ」トランスポザーゼ遺伝子がトランスポザーゼのコード領域内にテトラサイクリン耐性遺伝子(Tet^r)を挿入することにより不活性化された構築物(pMOS1Tet^r)を用いて、一連の注入実験を行った。トランスポザーゼタンパク質は、再び、接合体注入の約半数に取り込

まれた。胚及びニワトリからのDNA試料をPCRにより Te t^3 遺伝子及びプラスミドベクターの存在について分析し、そしてそれらのコピー数を評価した。プラスミドのみを注入した29の胚及びプラスミド+外因性トランスポザーゼを注入した34の胚を分析し、その結果を図4にグラフ的に示してある。0.05ゲノム当量より上のレベルで Te t^3 配列を含む胚の割合（トランスポザーゼなしの胚の17%そしてトランスポザーゼ添加の胚の24%）は、完全な「マリーナ」の導入の後に検出されたもの（トランスポザーゼなしの胚の6.6%そしてトランスポザーゼありの胚の7.8%）よりもはるかに低い。「マリーナ」配列を含む胚DNA試料はすべて検出可能な量のプラスミドベクターをも含んでいた（データは示していない）。一つのレベルで構築物を含む胚の少數は完全なプラスミドの無差別組み込みの結果であったであろう。再び、外因性トランスポザーゼの機能についての証拠はなかった。これらの結果から、pMOS1からニワトリゲノムDNA中の「マリーナ」因子の転移をもたらすトランスポザーゼ活性は、この構築物による機能性トランスポザーゼの発現から誘導されたものであることが示唆される。この結果は外因性トランスポザーゼタンパク質が機能的であったという可能性を決して排除するものではない。しかしこの結果はpMOS1から「マリーナ」の転移にとってそれは必要でなかったことを強く示している。

【0060】

実施例7：組み込まれた「マリーナ」因子の生殖系列安定性

それぞれが異なる染色体部位に組み込まれた1コピーの「マリーナ」を持っている2羽のG₁鳥、おんどり3および7（図2（a）、レーン4及び5）は、G₂世代への生殖系列伝達の後のこの因子の安定性を分析するために選択した。これらをそれぞれ家畜めんどうと交配し、その結果生じた胚からDNAを抽出し、そしてトランスジェニック胚を同定するためPCRによりスクリーニングした。おんどり3及びおんどり4からの非トランスジェニック子孫に対するトランスジェニック子孫の比（6.5:5.9及び6.4:5.7）は、予想されたメンデル比である1:1と有意に異なることはなかった。トランスジェニック胚からのゲノムDNAをBamH I及びHind IIIで消化し、そして「マリーナ」一ハイブリダイジング断片のパターンをトランスジェニック親中に存在する1本のバンドと

比較した。両おんどりからのトランスジェニック子孫はすべて親おんどり中に存在する制限断片と共に移動する1本の「マリーナ」バンドを持っていた（データは示していない）。不安定性の低いレベルは検出されなかつたであろうが、転移後の「マリーナ」の不安定性の証拠はない。

【0061】

実施例8：マウスにおける「マリーナ」転移のテスト

完全なプラスミド構築物（pMoss1）をマウスの受精卵の前核または細胞質に約1.5ng/ μ lの濃度で注入する。使用する方法はホワイトローら（Biological J. 286 31-39 (1992)）に記述されているとおりであり、そしてプリンスターら（Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82 4438-4442 (1985)）に基づいている。一部の実験では組換え体由来の、精製された「マリーナ」トランスポザーゼタンパク質又はmRNAが含まれる。マウス胚を代理母に転移させそして新たに生まれたマウスを「マリーナ」に関する何等かのトランスジェニックを検出するためスクリーニングする。トランスジェニックマウスはすべてさらに分析して、「マリーナ」因子がトランスポザーゼにより触媒された転移の結果としてマウス中に存在するのかそれとも全プラスミド構築物の無差別組み込みの結果なのかを決定する。

【0062】

討論

本研究はドロソフィラ・マウリティアーナの転移因子「マリーナ」がニワトリ接合体中への微量注入によるその導入後にニワトリゲノム中へ転移することができることを示している。「マリーナ」一含有プラスミドの運命を、ニワトリ胚への注入後、接合体状態でそして少なくとも12日の胚の発育時において分析した。従来の結果とは対照的に、同一の手順に従って、しかし様々な遺伝子構築物を用いて、「マリーナ」が20%を超える胚において細胞当たり1コピー当量のレベルで存在したことを見出した。「マリーナ」因子を保持したこのプラスミドベクターはこれらの胚のほとんど80%において検出可能な程には存在しなかつた。これらの結果から、「マリーナ」因子は最初のプラスミドから転移し、そしてニワトリのゲノム中に組み込まれることが示唆された。この解釈は、性的成熟ま

で生存しそしてその子孫のほぼ30%に「マリーナ」のコピーを伝達した「マリーナ」に対するトランスジェニックおんどりの分析により確認された。個々のG₁鳥の分析から、「マリーナ」の全部で6種の異なる挿入が異なる個体で存在することが示された。さらに、G₁トランスジェニック鳥から「マリーナ」の1コピーを単離したことから、完全な因子がニワトリのゲノムDNA中に転移しそしてこの転移事象が挿入部位において予想されたTA反復を形成したことが確認された（ブライアンら *Genetics* 125 103-114 (1990)）。G₂世代への生殖系列伝達後では、「マリーナ」の組み込まれたコピーの安定性に関する證拠は得られなかった。

【0063】

この分析により示されたニワトリゲノム中への「マリーナ」転移の頻度は高い（20%を越える）。しかしこれは付加的トランスジェニック鳥の形成により確認されねばならない。同一「マリーナ」因子のドロソフィラ・メラノガスターへの導入により得られた生殖系列の形質転換の頻度は4%と31%の間で変動し（ガルザら *Genetics* 128 303-310 (1991)）、類似の値である。G₁おんどりから遺伝的に承継したG₂鳥の割合はほぼ30%であり、線状の遺伝子構築物の導入後に得られた場合よりも10倍高い伝達頻度であった（ラブら *Bio/Technology* 12 60-63 (1994)）。G₁鳥の分析から、「マリーナ」の多重挿入があったことが示された。導入されたプラスミドから幾つかの独立の転移事象が起こったか、又は「マリーナ」の1コピーがニワトリのゲノムに転移しそしてこれが2回目の転移事象を受けたのかという二つの可能な説明のうちのいずれかの間を区別することは未だできない。「マリーナ」の二つのコピーがG₂世代へ安定に伝達されたという事実は、ニワトリのゲノム中に一旦組み込まれれば、「マリーナ」因子は安定である。「マリーナ」は、ディー・メラノガスターのゲノム中に転移した後にも安定であり、推定された除去割合は0.1%未満であった（ローエら *Genetics* 140 183-192 (1995)）。

【0064】

精製したトランスポザーゼタンパク質を微小注入の半分にpMOS1DNAと共に含めたが、PCR分析により、転移の頻度がこの酵素の添加により増加しな

かったことが示唆された。トランスポザーゼ遺伝子が $T \text{et}^R$ の挿入により不活性化されたときは、転移は検出されなかった。従って、観察された「マリーナ」転移事象はpMoss1中のトランスポザーゼ遺伝子の発現により触媒されたものと結論される。これまで、ニワトリ接合体に注入されたプラスミドDNAは胚の発育の最初の24時間の間にほぼ20倍複製されること（サング、エイチ、エム、及びペリー、エム、エム、Mol. Reprod. Dev. 1:98-106 (1989)）そしてレポーター遺伝子構築物は注入の9時間以内に検出され得ること（ペリーら Roux's Arch. Dev. Biol. 200:312-319 (1991)）が示されてきた。従って、トランスポザーゼ遺伝子の複製のための錫型として働くことができる発育の初期の段階の間に細胞当たりpMoss1の高いコピー数が存在するであろうと予想される。たとえ転写及び翻訳の効率が悪いとしても、転移を触媒するのに十分なトランスポザーゼが合成されうる。一旦「マリーナ」因子が組み込まれると、それらが完全なトランスポザーゼ遺伝子を保持するとしても、明らかに安定である。一旦この因子がニワトリの染色体中に組み込まれると、トランスポザーゼ遺伝子の発現は極めて効率が悪く、細胞当たりのコピー数は少数に過ぎなくなるであろう。

【0065】

これらの結果及びミノカサゴ (zebrafish)における「マリーナ」の転移に関する最近記述された証拠（ファデウールら Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 95:5182-5186 (1998)）は脊椎動物の遺伝子転移 (transgenesis) 用のベクターとしての「マリーナ」の開発を支持する有力な証拠である。遺伝子転移のために「マリーナ」由来のベクターを使用することは、幾つかの潜在的長所、特に家禽の遺伝子転移のための操作にとっての長所を持っている。組み込みの頻度は現在可能なレベルを越えて増加させうる。多重組み込み事象が一つのG₀トランスジェニック鳥の生殖系列に存在するという観察から、一つの創始鳥 (founder birds) から増殖することにより、ゲノムの異なる部位に挿入を有する幾つかのトランスジェニック系列を確立しうることが示唆される。1コピー転移遺伝子の発現が多重コピー配列で組み込まれた転移遺伝子よりも発現の低レベル制御を受け難いという証拠が蓄積しつつある（ガリックら Nature Genetics 18:56-59 (1998)）。

【0066】

「マリーナ」ベクターが1コピーとして転移遺伝子を組み込むという事実は、転移遺伝子の発現レベルをより一層予想可能とする結果を生ずるというさらなる長所を持つことになる。転移遺伝子を保持する「マリーナ」ベクターに「トランスポジ」トランスポザーゼ活性を与える方法を研究することが計画できる。転移遺伝子を組み込むように改変された「マリーナ」因子の転移の頻度そして「マリーナ」ベクターが保持することができる転移遺伝子のサイズが確立されねばならない。転移遺伝子発現の分析により、1コピーとして「マリーナ」ベクターに導入された転移遺伝子の発現が多重コピー配列における転移遺伝子の発現よりもより予想可能であるかどうかが確立されるであろう。「マリーナ」は「マリーナ」一族因子のスーパーファミリーの中で遺伝子転移のためのベクターとしての開発のための潜在能力を有する唯一のものである(ドーソン, エイ, 及びフィネガン, ディー, ジェイ, *Nature Bio.* 16 20-21 (1998)、ラズラ *Current Biol.* 8 82-88 (1998))。将来の発展は、特定の因子が他のものよりもベクターとしてより一層有効であるかどうか、又は特定の因子が別のものよりも一つの適用に関してより有用であるかどうかを明らかにするであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は「マリーナ」-含有プラスミドpMoss1の注入後少なくとも12日間生存した胚及び雛から抽出されたDNAのPCR分析を示す。図1(a)は、PCRによって同定された配列及びユニークな制限部位を示すpMoss1の線図を示す。図1(b)は表1に示した結果のグラフ表示である。先の一連の実験で注入された($n = 186$)リゾチーム遺伝子構築物のゲノム等量当たりの推定コピー数が「マリーナ」配列の推定コピー数と比較される。組換え体由来のトランスポザーゼタンパク質を付加してpMoss1を注射した場合と付加しないで注射した場合の結果を比較する。

【図2】

図2は「マリーナ」プローブとハイブリッド形成した個々のG:トランスポジニック雛から単離されたゲノムDNAのサザンプロット分析を示す。図2(a)は、それぞれが「マリーナ」とハイブリッドを形成する断片の新規なパターン

を持つ個々の雛（レーン1～7）及び親のG_v おんどり（レーン8）のBamH I/HindIII 消化物を示す。非トランスジェニック雛のDNAの対照消化物はレーン9に流した。図2（b）は図2（a）の場合と同じ鳥から得た試料のEcoRI消化物を示す。レーン2で矢印をしたバンドはpZAP13にクローニングしたEcoRI断片である（図3を参照）。

【図3】

図3は1個の組み込まれた「マリーナ」因子の特性決定を示す。図3（a）はBamHIとHindIIIで消化したG_v 雛それぞれ由来のゲノムDNAのサザンプロット（図2（a）からのもの）を細長く裁断しそしてpZAP13からのEcoRI挿入物で再調査した結果を示す。ある範囲の制限断片とのハイブリッド形成を、負の対照（レーン9）を含め、試料のすべてで観察することができる。図3（b）はpMoss1とpZAP13中の「マリーナ」因子の左端と右端をまたぐ配列の比較を示す。

【図4】

図4は、pMoss1Tetの導入後少なくとも12日のインキュベーションの間生存した胚及び雛からのDNA中にTet^r 遺伝子が存在するか否かのためのPCR分析を示す。Tet^r 遺伝子のコピー数は「材料及び方法」で記述したように推定し、そしてトランスポザーゼタンパク質の共一注入の結果はプラスミド単独注入の結果と比較した。

【図1】

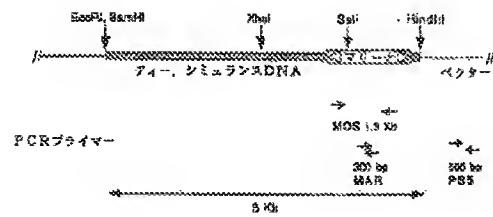


FIG.1A.

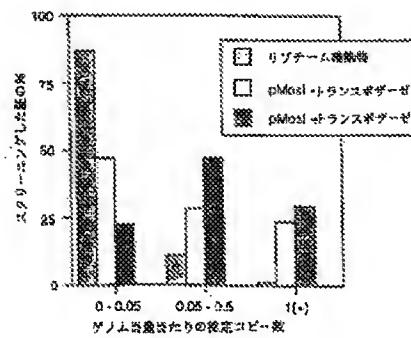


FIG.1B.

【図2】

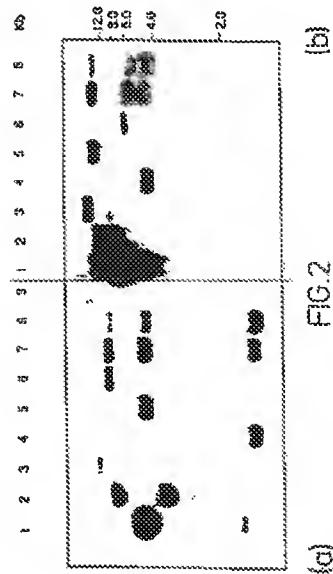


FIG.2

(b)

(d)

【図3】

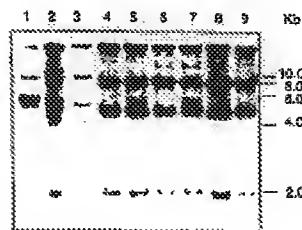


FIG.3A.

pRNA1: 5'-TTTAACTTTC
TACCAAGTGATAC.....GTACAGCTGATA
TACCAAGTGATAC.....GTACAGCTGATA
pRNA11: 3'-CACTTCTCTT
GTTGGCGGCGGC'

FIG.3B.

【図4】

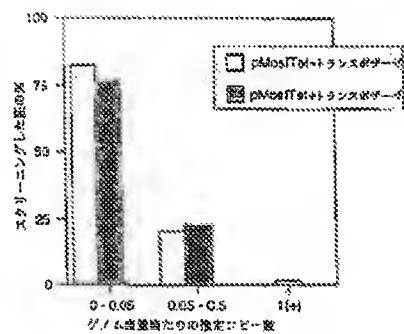


FIG.4

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年2月21日(2000.2.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 鳥類又は非ヒト哺乳動物の胚細胞中に、転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子（MLE）を導入する工程を含み、外因性のトランスポザーゼタンパク質又はトランスポザーゼをコードするDNA配列の導入工程を任意選択可能に含んで成る鳥類又は非ヒト哺乳動物のトランスジェニック胚を調製する方法。

【請求項2】 前記鳥類が家禽である、例えばガルス・ドメスティクスである、請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記非ヒト哺乳動物が有蹄類である、請求項1記載の方法。

。

【請求項4】 前記有蹄類が雌牛もしくは雄牛、ヒツジ、ヤギ、水牛、ラクダ又はブタである、請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である、請求項1記載の方法。

【請求項6】 前記げっ歯動物がラット又はマウスである、請求項5記載の方法。

。

【請求項7】 前記非ヒト哺乳動物がウサギである、請求項1記載の方法。

。

【請求項8】 前記「マリーナ」一様因子がドロソフィラ・マウリティアナ由来の転移因子「マリーナ」である、請求項1～請求項7いずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子がコンストラクト中

の細胞内に導入されるものである、請求項1～請求項8いずれか1項に記載の方
法。

【請求項10】 「マリーナ」一様因子（MLE）の導入が細胞質中への又
は接合体の前核もしくは鳥類又は非ヒト哺乳動物胚細胞の核中へのMLEの注
入により達成されるものであり、又はMLEの導入が電気穿孔法により又はリボ
ソームを用いることにより達成されるものである、先行する請求項のいずれか1
項に記載の方法。

【請求項11】 転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子（MLE）を成熟
細胞内に導入する工程を含み、外因性トランスポザーゼタンパク質又はトランス
ポザーゼをコードするDNAの共一導入を任意選択可能に含んで成る鳥類又は非
ヒト哺乳動物のトランスジェニック胚を調製する方法。

【請求項12】 転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子（MLE）を胎児
細胞内に導入する工程を含み、外因性トランスポザーゼタンパク質又はトランス
ポザーゼをコードするDNAの共一導入する工程を任意選択可能に含んで成る鳥
類又は非ヒト哺乳動物のトランスジェニック胚を調製する方法。

【請求項13】 結果として得られる鳥類又は非ヒト哺乳動物胚が、(i)
(ii) 転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子を導入しそれを染色体中に挿入した後
その細胞の核を取得する工程、及び(ii) 続いて除核された卵母細胞中にその核を
導入し、この細胞を発育させる工程により調製されるものである、先行する請求
項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】 (a) 先行する請求項のいずれか1項に記載の胚を調製す
る工程、
(b) 該胚から分娩まで鳥類又は非ヒト哺乳動物を発育
させる工程、そして、任意選択可能に
(c) 工程(b)でこうして形成された鳥類又は非ヒト
哺乳動物から増殖させる工程、
を含んで成る鳥類又は非ヒト哺乳動物を調製する方法。

【請求項15】 前記胚の完全発育の前に該胚がさらに操作されるものであ
る、請求項14記載の方法。

【請求項16】 請求項14又は請求項15記載の方法により調製されるトランスジェニック鳥類又は非一ヒト哺乳動物。

【請求項17】 転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子（MLE）を鳥類又は哺乳動物細胞内に導入する工程を含み、外因性トランスポザーゼタンパク質又はトランスポザーゼを封入する（enclosing）DNAもしくはRNA配列の共一導入を任意選択可能に含んで成る鳥類又は哺乳類のトランスジェニック細胞を調製する方法。

【請求項18】 遺伝子の不存在又は遺伝子の突然変異により惹起される病的状態の治療に使用するための「マリーナ」一様因子。

【請求項19】 遺伝子の不存在又は遺伝子の突然変異により惹起される疾病の予防又は治療のための薬剤の調製における「マリーナ」一様因子の使用。

【請求項20】 遺伝子の不存在又は遺伝子の突然変異により惹起される病的状態の治療方法であって、転移遺伝子を含む「マリーナ」一様因子を鳥類又は哺乳動物細胞中に導入する工程を含み、トランスポザーゼタンパク質又はトランスポザーゼをコードするDNAを導入する工程を任意選択可能に含んで成る方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/GB 98/02517
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A01K67/027 C12N15/90		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A01K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 29202 A (HET NEDERLANDS KANKER INSTITUUT (NL); PLASTERK K.H.A.; VDS J.C.) 14 August 1997 see page 2, line 34 - page 6, line 20 see page 24 - page 25; claims	1,6-8, 12-17
Y	WO 97 07669 A (ROSLIN INSTITUTE EDINBURGH (GB); CAMPBELL K.H.S.; WILMUT I.) 6 March 1997 cited in the application see abstract see page 5, line 10-24 see page 7, line 1-11 see page 35 - page 36; claims	2-5,9-11
	2-5,9-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of item C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in section		
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on patentability or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		
<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance to the claimed invention, either the corresponding novel or distinct or considered to disclose an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"V" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in combination or in contrast with such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"S" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
4 December 1998	21/12/1998	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkantoor 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 345-2242, Tx. 31 651 spec. 6 Fax. (+31-70) 349-8016	Authorized officer Macchia, G	

Form PCT/ISA219 (revised edition) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C(ombination) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Description of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SMITH J.C. AND FINNEGAR D.: "Mariner transposase" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. Supplement, no. 21A, 10 March 1995 - 4 April 1995, page 227 XPC02086553 Abstract C3-421 see the whole document	1,6-8, 12-14
A	LICHOLM B.-A. ET AL.: "The transposable element mariner mediates germline transformation in <i>Drosophila melanogaster</i> " GENETICS, vol. 134, 1 July 1993, pages 859-868, XP000576390 see abstract see page 861, left-hand column, paragraph 1	6 1,6-8, 12-14
X	VAN LUENEN H.G.A.M. ET AL.: "The mechanism of transposition of Tc3 in <i>C. elegans"</i> CELL, vol. 79, 21 October 1994, pages 293-301, XP002086538 see page 293, left-hand column, paragraph 1-2 see page 299, right-hand column, paragraph 4	9
A	FAROOQ J.M. ET AL.: "Transposition of the mariner element from <i>Drosophila mauritiana</i> in zebrafish" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 95, April 1998, pages 5182-5186, XP002086539 cited in the application see abstract see page 5186	6 1,6-8, 12-14
A	WO 90 11355 A (NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION (GB); SYMKISS K.) 4 October 1990 see page 1, line 5-12	8
A	FERRY M.M. AND SANG H.N.: "Transgenesis in chickens" TRANSGENIC RESEARCH, vol. 2, no. 3, May 1993, pages 126-133, XP002086865	6
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 98/02517

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ...		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
T	SHERMAN A. ET AL.: "Transposition of the Drosophila element mariner into the chicken germ line" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, November 1998, pages 1050-1053, XP002086540 -----	

Form PCT/ISA/010 (Document No. 97 second edition) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB 98/02517

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. **Claims Not:**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim(s) 17
is(are) directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. **Claims Not:**
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. **Claims Not:**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members			International Application No PCT/GB 98/02517		
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9720202 A	14-08-1997	AU 1874697 A	28-08-1997		
WO 9707669 A	06-03-1997	AU 6831096 A CA 2229568 A CZ 9900608 A EP 0849990 A GB 2318578 A NO 9808445 A PL 325331 A	19-03-1997 06-03-1997 15-07-1998 01-07-1998 29-04-1998 29-04-1998 20-07-1998		
WO 9011356 A	04-10-1990	AU 648502 B AU 5287990 A CA 2050925 A EP 0463047 A GB 2229440 A JP 4504056 T	28-04-1994 22-10-1990 18-09-1990 02-01-1992 26-09-1990 23-07-1992		

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ
, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML
, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K
E, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM
, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, D
K, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR
, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP,
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, L
V, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ
, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI
, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, U
S, UZ, VN, YU, ZW
Pターム(参考) 4B024 AA01 AA10 AA11 AA20 BA07
BA10 BA80 CA02 CA12 DA02
DA06 EA04 GA12 GA13 GA14
GA30